

Deux modèles d'étude « du gène à la fonction » : le syndrome de Rett et les groupes sanguins

Les développements technologiques au cours des dix dernières années en matière de diagnostic moléculaire, en particulier avec le séquençage de nouvelle génération (NGS : « *next-generation sequencing* »), ont largement contribué à l'identification de très nombreuses variations de natures diverses dans le génome. Alors que les barrières techniques à la découverte de ces variants sont désormais levées, leur impact fonctionnel et leur lien direct avec l'expression phénotypique restent néanmoins complexes à interpréter. Les travaux présentés illustrent cette démarche par l'étude de deux modèles : le syndrome de Rett et les groupes sanguins.

Le syndrome de Rett est une maladie génétique neurodéveloppementale progressive grave. Cette pathologie affecte quasi-exclusivement les filles et est définie par les critères d'Hagberg, qui incluent aussi bien des symptômes obligatoires (perte du langage, altération de la marche...) ou en faveur du diagnostic (troubles respiratoires, retard de croissance...) que des critères d'exclusion. Trois gènes sont associés à ce syndrome : *MECP2*, *CDKL5* et *FOXG1*, qui codent respectivement un régulateur transcriptionnel, une kinase et un facteur de transcription. De nouveaux mutants identifiés chez des patients ont été rapportés dans ces trois gènes et leur étude a contribué à décrire les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ce syndrome. De nouvelles cibles directes et indirectes de MeCP2 impliquées dans les mécanismes de survie et d'apoptose ont ainsi été identifiées, suggérant qu'un défaut fonctionnel de la protéine altère la survie des neurones et les fonctions cérébrales. Par ailleurs, un rôle potentiel de CDKL5 dans les processus de différenciation et de maturation neuronale et, pour la première fois, une interaction directe de CDKL5 avec un mutant de FoxG1 ont été mis en évidence.

Le statut sanguin érythrocytaire est un enjeu majeur de Santé Publique dans un contexte transfusionnel (donneur/receveur) ou obstétrical (mère/enfant). Trente-cinq systèmes (ou groupes) sanguins érythrocytaires associés à 40 gènes ont été caractérisés depuis la découverte du système ABO en 1900. En routine, la méthode de référence pour le typage des groupes sanguins reste l'analyse sérologique. Cependant, dans un certain nombre de cas, cette méthode n'est pas satisfaisante. Il faut alors avoir recours à des études moléculaires pour caractériser le génotype et finalement en déduire un phénotype. Le génotypage a donc un intérêt diagnostique majeur qui guide la conduite du clinicien et contribue à garantir la sécurité des patients. Mes travaux au laboratoire s'articulent principalement autour de quatre axes :

1. Développement technologique pour le diagnostic moléculaire, notamment avec la mise au point d'une stratégie permettant d'identifier potentiellement toutes les variations alléliques (> 300) du système Rh, le système le plus complexe et le plus polymorphe, qui implique les gènes homologues *RHD* et *RHCE* ; et la mise en place, pour la première fois, d'une méthode de génotypage de 17 gènes impliqués dans 14 systèmes sanguins par une approche NGS ;
2. Identification et la caractérisation des variants rares, principalement dans les gènes *RHD* et *RHCE*, contribuant à la description de plusieurs dizaines de nouveaux allèles ;
3. Epidémiologie moléculaire du système Rh, dans la population d'origine africaine de l'Ouest de la France à partir du recrutement local et dans la population albanaise grâce à une collaboration internationale ;
4. Caractérisation fonctionnelle des variants d'épissage du gène *RHD*, qui a permis de classer près de 40 variants selon leur impact.

Dans la continuité de ces études, les principaux projets en cours et à venir sont les suivants :

- Etude moléculaire d'une cohorte de patients drépanocytaires brésiliens (N = 1600) par la technologie NGS, en collaboration avec un laboratoire brésilien (Dr José Eduardo Levi, Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo, São Paulo, Brazil) ;
- Analyse moléculaire des variants *RHD* et *RHCE* dans la population indienne, en collaboration avec le laboratoire de référence en immunohématologie en Inde (Dr Swati Kulkarni, National Institute of ImmunoHaematology (NIIH), Mumbai, India) ;
- Caractérisation fonctionnelle des variants faux-sens du gène *RHD*. Ce projet devrait permettre d'identifier et de caractériser des motifs peptidiques impliqués dans l'interaction de la protéine RhD avec son partenaire RhAG, d'étudier son intégration dans la membrane et de définir un modèle simple permettant de caractériser les nouveaux variants identifiés au laboratoire ;
- Caractérisation des variants d'épissage des gènes *KEL*, *ABCB6* et *ABCG2* impliqués dans les groupes sanguins Kell, Langereis et Junior, respectivement, en utilisant le système « minigène » développé au laboratoire et déjà publié.

From gene to function: Rett syndrome and blood groups

For the past ten years technological developments, such as next-generation sequencing (NGS), have contributed to the identification of a tremendous number of genetic variations within the human genome. While technical hurdles have been overcome, the respective functional effects of these variants, as well as their direct involvement in the phenotypic expression, remain to be elucidated. In this work two models illustrate the pathways towards the understanding of the molecular mechanisms from gene to function: Rett syndrome and red cell blood groups.

Rett syndrome is a severe, progressive, neurodevelopmental genetic disease that mainly affects girls. It is notably characterized by loss of acquired purposeful hand skills, loss of acquired spoken language, gait abnormalities and stereotypic hand movements, but also breathing disturbances and growth retardation. Three genes have been associated to the disease: *MECP2*, *CDKL5* and *FOXG1*, which encode a transcriptional regulator, a kinase-like protein, and a transcription factor, respectively. Novel mutants identified in patients were reported in these genes and subsequent functional studies contributed to decipher the pathophysiological mechanisms of Rett syndrome. Novel direct and indirect MeCP2 targets involved in both cell survival and apoptosis were identified, suggesting that a functional defect of the protein alters neuronal survival and brain function. Additionally the potential role of CDKL5 in differentiation process and neuronal development was shown, and for the first time a direct functional interaction between CDKL5 and FoxG1 was demonstrated.

Blood group status is a critical issue in Public Health in both transfusion (donor/patient) and obstetrical medicine (mother/infant). Thirty-five blood systems associated to 40 genes have been characterized since the identification of the ABO blood group in the early 20th Century. While serological analyses remain the gold-standard typing methods for routine applications, molecular typing methods, i.e. genotyping, must be carried out to predict the phenotype in specific situations. Genotyping has thus a major diagnostic interest and helps clinicians in the management of alloimmunization to guarantee patient safety. This work has mainly focused on four axes:

1. Technological development for molecular diagnosis: implementation of a strategy that may theoretically identify all *RH* allele variants (> 300); and, for the first time, development of a NGS-based method for extended blood group genotyping of 17 genes involved in 14 groups;
2. Identification and characterization of rare variants in the *RH* (*RHD* and *RHCE*) and *ABO* genes that extend the current knowledge of molecular genetics of blood group genes;
3. Molecular epidemiology of the Rh system in the Western French population of African origin and the Albanese population (collaborative study);
4. Functional characterization and classification of ~40 *RHD* splice site variants.

Ongoing projects take advantage of the expertise developed at the laboratory and aim to extend the fundamental knowledge of blood group physiology:

- NGS-based molecular typing of patients with sickle cell disease (N = 1600), in collaboration with a Brazilian laboratory (Dr José Eduardo Levi, Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo, São Paulo, Brazil) ;
- Molecular analysis of *RH* gene variants in the Indian population, in collaboration with the reference laboratory of immunohematology in India (Dr Swati Kulkarni, National Institute of ImmunoHaematology (NIIH), Mumbai, India) ;
- Functional characterization of missense *RHD* variants. This project aims 1/ to identify peptide motifs involved in the intermolecular interaction between RhD and its accessory protein RhAG, 2/ to study its integration within the plasma membrane, and 3/ to implement a simple model for phenotypic characterization of novel variants;
- Characterization of splice site variants of the *KEL*, *ABCB6* and *ABCG2* genes involved in the Kell, Langereis and Junior blood groups, respectively, by the minigene splicing assay already experienced at the laboratory.